

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/82, 15/53, A01N 63/00, A01H 5/00</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/22707</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. Juni 1997 (26.06.97)	
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/02428		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 17. December 1996 (17.12.96)		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 195 47 272.1 19. December 1995 (19.12.95) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: CERFF, Rüdiger [DE/DE]; Karlsstrasse 28, D-38106 Braunschweig (DE). DÜRING, Klaus [DE/DE]; Eichenring 16, D-06507 Gernrode (DE). HEHL, Reinhard [DE/DE]; Schubertstrasse 1, D-38114 Braunschweig (DE). KÖHLER, Uwe [DE/DE]; Lindenweg 25, D-31559 Haste (DE).			
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			
(54) Title: AN EXPRESSION SYSTEM FOR ANAEROBIC GENE EXPRESSION IN HIGHER PLANTS			
(54) Bezeichnung: EIN EXPRESSIONSSYSTEM FÜR DIE ANAEROBE GENEXPRESSION IN HÖHEREN PFLANZEN			
(57) Abstract			
The invention relates to an expression system for anaerobic gene expression in higher plants. The expression system according to the invention comprises the promoter GapC4 or parts or variants thereof and a gene to be expressed.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung betrifft ein Expressionssystem für die anaerobe Genexpression in höheren Pflanzen. Das erfindungsgemäße Expressionssystem umfaßt den Promoter GapC4 oder Teile oder Varianten des Promotors GapC4 und ein zu exprimierendes Gen.			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

## Ein Expressionssystem für die anaerobe Genexpression in höheren Pflanzen

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Expressionssystem für die anaerobe Genexpression in höheren Pflanzen. Ein konkretes Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Landwirtschaft, insbesondere die Resistenzzüchtung und die Steigerung der Leistungsfähigkeit von Nutzpflanzen.

Der Verlust an Erntegut durch Erkrankungen von Pflanzen ist ein weltweites Problem. Zum Beispiel führt die Erkrankung der Kartoffel an Knollennaßfäule (Verfaulen der Knolle) und Schwarzbeinigkeit (Verfaulen der unteren Stengelabschnitte), nach Infektion durch das phytopathogene Bakterium *Erwinia carotovora*, weltweit zu Ernteverlusten in einer geschätzten Höhe von 100 Millionen Dollar (Pérombelon und Kelman, 1980, Ann. Rev. Phytopathol., 18, 361-387). Es gibt eine Reihe von Arbeiten, die sich mit der gentechnischen Übertragung von Resistenzfaktoren auf Pflanzen beschäftigen (Lamb et al., 1992, Bio/Technology, 10, 1436-1445; Hain und Fischer, 1994, Current Opinion in Biotechnology, 125-130; Zhu et al., 1994, Bio/Technology, 12, 807-812). Zur Resistenzsteigerung der Kartoffel gegenüber *Erwinia carotovora* wurde das T4 Lysozymgen des Bakteriophagen T4 in transgenen Kartoffeln exprimiert (Düring et al., 1993, Plant J. 3, 587-598).

Da sich bakterielle Erkrankungen von Pflanzen jedoch oft unter anaeroben Bedingungen ausbreiten, werden die bisher übertragenen Resistenzfaktoren für Pflanzen nur sehr eingeschränkt wirksam. Das gilt besonders für die oben erwähnte Erkrankung der Kartoffel an Knollennaßfäule und Schwarzbeinigkeit, da die Infektion durch *Erwinia carotovora* überwiegend unter anaeroben Bedingungen erfolgt. Verstärkt wird dieser Effekt noch durch die Bildung eines Schleims aus Bakterien und Abbauprodukten der pflanzlichen Zellwand. Für

ERSATZBLATT (REGEL 26)

eine effektive Expression eines antibakteriellen Proteins unter optimalen Bedingungen ist deshalb die Steuerung des entsprechenden Fremdgens durch einen unter diesen Bedingungen aktiven Promotor anzustreben.

Bisher wurden 3 anaerobe Promotoren in transgenen Pflanzen getestet: Dabei handelt es sich um den *Adh1* Promotor aus Mais, den *Adh* Promotor aus *Arabidopsis thaliana* und den *GapC* Promotor aus *Arabidopsis thaliana*. Der *Adh1* Promotor aus Mais wurde in Tabak und Reis untersucht (Ellis et al., 1987, EMBO J. 6, 11-16; Kyoizuka et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 228, 40-48), der *GapC* Promotor aus *Arabidopsis* wurde in Tabak (Yang et al., 1993, Plant Physiol. 101, 209-210), und der *Adh* Promotor aus *Arabidopsis* wurde in *Arabidopsis* selber untersucht (Dolferus et al., 1994, Plant Physiol. 105, 1075-1087). Dabei stellte sich heraus, daß alle Promotoren nur eine 2 bis 81 fache Induktion des Reportergens über Hintergrund vermitteln und nicht in allen Geweben aktiv sind.

Ziel der Erfindung ist es, die Expression von Resistenzfaktoren in Nutzpflanzen zu erreichen und entsprechende transgene Pflanzen zu erzeugen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die anaerobe Expression des T4 Lysozyms in der Kartoffel zu erreichen und entsprechende transgene Pflanzen zu erzeugen. Eine spezifische Aufgabe besteht darin, Kartoffeln gegenüber phytopathogenen Bakterien resistent zu machen.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Expressionssystem gelöst, das den Promotor *GapC4* oder Teile oder Varianten des Promotors *GapC4* und ein zu exprimierendes Gen umfaßt.

Gemäß der Erfindung handelt es um Gene für ein antibakterielles Protein, insbesondere für T4-Lysozym, um Resistenzgene gegen Viren, Nematoden, Bakterien und Pilze, Gene mit insektizider Wirkung, glykolyse-steigernde Gene und gärungssteigernde Gene.

Das Expressionssystem wird erfindungsgemäß für die anaerobe Genexpression in höheren Pflanzen angewendet. Bevorzugt kommt es in Kulturpflanzen wie Kartoffeln, Reis, Getreide, Mais, Tomaten, Brassicaceen, Leguminosen, Baumwolle, Zuckerrübe und Möhren zur Anwendung.

Die Erfindung betrifft auch höhere Pflanzen, vorzugsweise transgene Kulturpflanzen wie Kartoffeln, Reis, Getreide, Mais, Tomaten, Brassicaceen, Leguminosen, Baumwolle, Zuckerrübe und Möhren, die das erfindungsgemäße Expressionssystem enthalten.

Von besonderer Bedeutung sind transgene Kartoffeln, die ein Expressionssystem aus Promotor GapC4 und dem Gen für T4-Lysozym enthalten.

Der große Vorteil des erfindungsgemäß eingesetzten Promotors GapC4 (GenBank Accession Nr. L40803) besteht darin, daß er ein für die Zielstellung hervorragend geeignetes Induktionsprofil hat. Die anaerobe Expression erreicht die Stärke des unter aeroben Bedingungen für die Expression von Fremdgenen häufig verwendeten 35S Promotors des Blumenkohl Mosaikvirus (35S CaMV). Weiterhin ist der Promotor in allen Geweben, wie Blüte, Blatt und Wurzel, aktiv. Bisher wurde die Isolierung des GapC4 Gens sowie die anaerobe Induktion des GapC4 Promotors in einem transienten Expressionssystem in Mais Suspensionskulturzellen veröffentlicht (Kersanach et al., 1994, Nature 367:387-389).

Überraschenderweise ist der Promotor besonders in der Kulturpflanze Kartoffel aktiv.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung:

Ein weiteres Problem sind besonders in feuchtem Klima zeitweise Überflutungen von Feldern, die zu Ernteaussfällen führen können. Als aerobe Organismen können Pflanzen längere Perioden großer Feuchtigkeit, die zur Abnahme des für die

Pflanze verfügbaren Sauerstoffs führt, nicht überleben (Perata und Alpi, 1993, Plant Sci. 93, 1-17). Die Toleranz von Pflanzen gegenüber unzureichender Sauerstoffversorgung ist für einzelne Arten recht unterschiedlich. So keimt der Embryo in der Reis-Karyopse auch unter solchen Bedingungen ohne Schwierigkeiten, wohingegen Maiskeimlinge nur ca. 24 Stunden ohne Sauerstoff überleben. Eine generelle Anpassungsstrategie höherer Pflanzen an anaerobe Bedingungen ist die Steigerung der Glykolyse sowie das Anschalten von Gärvorgängen. Um die Toleranz von Pflanzen gegenüber unzureichender Sauerstoffversorgung zu erhöhen, können die Gene, die bei der Glykolyse sowie bei der Gärung beteiligt sind unter die Kontrolle eines anaerob induzierbaren Promotors gebracht werden. Diese Gene werden dann bei unzureichender Sauerstoffversorgung exprimiert.

Die Erfindung wird nachfolgend an Ausführungsbeispielen näher erläutert.

#### Ausführungsbeispiel

Um zu untersuchen, ob der *GapC4* Promotor bei der Kartoffel anaerob, sowie nach Infektion mit *Erwinia carotovora* induziert wird, werden *GapC4* Promotor-Reporterogenkonstrukte in die Kartoffel transformiert. Nach Infektion der transgenen Kartoffel mit *Erwinia carotovora*, sowie nach Inkubation von Geweben der transgenen Kartoffel unter anaeroben Bedingungen kann die Reporterexpression gemessen werden. Das Reporterogen kann dann in vitro durch das T4 Lysozymgen ersetzt werden und in die Kartoffel transformiert werden. Die transgenen Kartoffeln werden anschließend auf erhöhte Resistenz gegen *Erwinia carotovora* untersucht.

Die Reporterogenkonstrukte wurden wie im folgenden beschrieben konstruiert:

Alle Agrobakterium T-DNA Konstrukte basieren auf dem binären Vektor pOCA28 (Honma et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 90, 6242-6246; Olszewski et al., 1988, Nucleic Acids Res 16, 10765-10782). Für T-DNA Konstrukte wurden Plasmide pUK443 und pUK444, die 785 bzw. 461 Basenpaare des GapC4 Promotors, das erste Intron des GapC4 Gens sowie das  $\beta$ -Glucuronidase Reportergen tragen, eingesetzt. Um mögliche negative Effekte des GapC4 Introns aus Mais in transgenen Tabakpflanzen und Kartoffeln auszuschließen, wurde das Intron durch Restriktionsverdau mit den Enzymen XhoI und NcoI aus den Plasmiden pUK443 und pUK444 herausgeschnitten. Nach einer Auffüllreaktion der durch Restriktionsverdau entstandenen Enden wurden die intronlosen Plasmide pUK403 und pUK404 erzeugt. Die Promotor-Reportergenfragmente dieser Plasmide wurden durch einen PvuII Verdau herausgeschnitten und in die SmaI Schnittstelle von pOCA28 kloniert. Die daraus resultierenden pOCA28 Derivate, pUK4030, 4040 und 4041 tragen das GapC4 Promotor-Reportergenkonstrukt. Als Kontrolle wurde das promotorlose  $\beta$ -Glucuronidase Reportergen in pOCA28 kloniert. pUK4030 und 4040 tragen die Reportergenkonstrukte mit dem Promotor proximal zur rechten T-DNA Bordersequenz. In pUK4041 liegt das Reportergen in der anderen Orientierung vor.

Alle rekombinanten DNA Techniken werden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989, Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Für die Klonierung des T4-Lysozymgens, kann das  $\beta$ -Glucuronidase Reportergen aus den Plasmiden pUK403 oder 404 durch Restriktionsverdau entfernt und an seine Stelle das T4-Lysozymgen hineinkloniert werden. Das durch den GapC4 Promotor kontrollierte T4 Lysozymgen wird in einen Agrobakterium T-DNA Vektor umkloniert. Alle Konstrukte werden nach Einführung in *Agrobacterium tumefaciens* gemäß Standardprotokollen in die Kartoffel transformiert (Düring et al., 1993, Plant J. 3, 587-598; Fladung, 1990, Plant Breeding 104, 295-304). Transgene Kartoffeln werden mit Hilfe eines Antibiotikaresistenzgens auf der T-DNA selektiert und werden auf Expression des eingeführten  $\beta$ -Glucuronidase Reportergens

und des T4 Lysozyngens unter anaeroben Bedingungen sowie nach Infektion mit *Erwinia carotovora* untersucht.

Zur anaeroben Induktion wird pflanzliches Gewebe in einem luftdichten Glasbehälter (Merck) zusammen mit Anaerocult A (Merck) für mindestens 12 Stunden inkubiert. Für den fluorimetrischen GUS assay wird das Pflanzenmaterial homogenisiert und mit dem  $\beta$ -Glucuronidase Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG) bei 37 °C inkubiert. Quantifizierungen der Fluoreszenz wird nach Jefferson et al., EMBO J. 6, 3901-3907 (1987) durchgeführt und Proteinkonzentrationen werden nach Bradford, Anal. Biochem. 7, 248-254 (1976) bestimmt. Um die Gewebespezifität der Reportergenexpression zu messen wird das intakte anaerob induzierte Pflanzenmaterial mit einer Lösung 1 mM X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure) vakuumfiltriert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur besseren Sichtbarmachung der Anfärbung wird das Chlorophyll mit 70 % Ethanol extrahiert (Jefferson s.o.).

Um die Expression des T4 Lysozyngens zu messen, werden nach anaerober Inkubation des Gewebes Northern blot Analysen mit einer T4-Lysozym spezifischen Sonde durchgeführt. Gesamt RNA wird mit dem RNeasy Kit isoliert (Qiagen). Die Konzentration der RNA wird photometrisch bestimmt und 10 Microgramm der RNA wird in eine Spur auf ein 1 % Agarosegel gegeben, welches Formaldehyd enthält. Nach Elektrophorese wird die RNA aus dem Gel mit 0,05 N NaOH als Transferpuffer auf Nitrozellulose oder Nylonmembranen (Amersham) geblottet (Sambrook et al. s.o.). Markierung und Hybridisierung der T4 Lysozym spezifischen Sonde mit dem RNA Filter erfolgt nach Standardbedingungen (Sambrook et al. s.o., Düring et al., s.o.).

Nach Bestätigung der anaeroben Induktion des Reportergens sowie des T4-Lysozyngens wird untersucht, ob beide Gene auch nach Infektion mit dem phytopathogenen Bakterium *Erwinia carotovora* induziert werden, bzw. ob das T4 Lysozym-Gen unter der Kontrolle des GapC4-Promotors so aktiviert wird, daß es Resistenz vermittelt. Die Induktion des Reportergens und des T4 Lysozym-Gens wird wie oben beschrieben bestimmt. Dafür



wird das unter dem mazerierten Gewebe liegende Knollenmaterial genutzt.

Der Infektionstest wird mit einem pathogenen Stamm von *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* oder *ssp. carotovora* in Plastikbehältern unter Luftabschluß durchgeführt. Aus Kartoffelknollen werden Scheiben definierter Größe hergestellt und in frisch geschnittenem Zustand mit einer definierten Anzahl von Bakterienzellen in einem kleinen Volumen in der Mitte inokuliert. Die Inkubation erfolgt in Plastikbehältern mit einer Wasserschicht auf dem Boden auf einem durchnässten Filterpapier. Dadurch wird gesättigte Luftfeuchtigkeit erreicht. Das Bakterienwachstum wird anhand der Gewebemazeration und des entstehenden Bakterien Schleims nachverfolgt. Durch den sich bildenden Bakterien Schleim erfolgt eine luftabschließende Abdeckung der Kartoffelzellen. In Abhängigkeit von der Inokulumsdichte wird nach einer definierten Zeit das Ausmaß der Mazeration bestimmt. Durch Vergleich mit Kontrollexplantaten kann der relative Rückgang der Suszeptibilität festgestellt werden.

Alternativ können mit Bakterien infizierte Augenstecklinge unter feuchten Bedingungen im Gewächshaus ausgepflanzt und kultiviert werden. Durch Verschlämmung der Erde kommt es zu Sauerstoffarmut, die die Vermehrung der Bakterien begünstigt. Die Anzahl aufgelaufener, gesunder Sprosse wird im Vergleich zu Kontrollexplantaten bestimmt. Dadurch ist das Ausmaß der reduzierten Suszeptibilität bestimmbar.

ERSATZBLATT (REGEL 26)

**Patentansprüche**

1. Expressionssystem für die anaerobe Genexpression in höheren Pflanzen umfassend den Promotor GapC4 und ein zu exprimierendes Gen.
2. Expressionssystem nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Teile oder Varianten des Promotors GapC4.
3. Expressionssystem nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch ein Gen für ein antibakterielles Protein.
4. Expressionssystem nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch ein Gen für T4-Lysozym.
5. Expressionssystem nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch Resistenzgene gegen Viren, Nematoden, Bakterien und Pilze.
6. Expressionssystem nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch Gene mit insektizider Wirkung.
7. Expressionssystem nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch glykolysesteigernde Gene.
8. Expressionssystem nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch gärungssteigernde Gene.
9. Expressionssystem nach Anspruch 1 bis 8 zur Anwendung in allen höheren Pflanzen.
10. Expressionssystem nach Anspruch 1 bis 8 zur Anwendung in Kulturpflanzen.
11. Expressionssystem nach Anspruch 10 zur Anwendung in Kartoffeln, Reis, Getreide, Mais, Tomaten, Brassicaceen, Leguminosen, Baumwolle, Zuckerrübe und Möhren.

12. Transgene höhere Pflanzen, enthaltend ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 11.

13. Transgene Kulturpflanzen nach Anspruch 12.

14. Transgene Kartoffeln enthaltend ein Expressionssystem aus Promotor GapC4 und dem Gen für T4-Lysozym.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/DE 96/02428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/82 C12N15/53 A01N63/00 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N A01N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBL SEQUENCE DATABASE. REL. 43, 30-MAR-1995, ACCESSION NO. L40803, XP002031332 KERSANACH, R., ET AL.: "Zea mays glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GapC4) gene, promoter region" cited in the application see sequence and comment	1,2
Y	& NATURE, vol. 367, 1994, pages 387-389, KERSANACH, R., ET AL.: --- -/--	1,2,12, 13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 1997

Date of mailing of the international search report

30.05.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/ISA/210 E 96/02428

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, PORTLAND, OREGON, USA, JULY 30-AUGUST 3, 1994. PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE) 105 (1 SUPPL.). 1994. 70. , XP002031350 MANJUNATH S ET AL: "Differential regulation of maize glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene family under anoxia." see abstract 347	1,2,12, 13
P,X	--- PLANT JOURNAL 10 (1). 1996. 175-183. , XP002031333 KOEHLER U ET AL: "A promoter for strong and ubiquitous anaerobic gene expression in tobacco." see the whole document	1-4,9-14
P,X	--- PLANT MOLECULAR BIOLOGY 29 (6). 1995. 1293-1298. , December 1995, XP002031334 KOEHLER U ET AL: "The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus Cl." see the whole document	1,2,9-11
A	--- MOL. GEN. GENET., vol. 229, 1991, pages 219-228, XP002031351 RUSSELL, D.A., ET AL.: "The maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis" see the whole document	1,2
A	--- PLANT PHYSIOLOGY, vol. 101, 1993, pages 209-216, XP002031335 YANG, Y., ET AL.: "Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in Arabidopsis" cited in the application see the whole document	1,2,9,12
A	--- PLANT PHYSIOLOGY, vol. 99, 1992, pages 615-620, XP002031336 RUSSELL, D.A., ET AL.: "Protein synthesis in maize during anaerobic and heat stress" see the whole document --- -/--	1,2,9,12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 96/02428

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>THE PLANT JOURNAL, vol. 3, no. 4, 1993, pages 587-598, XP002031337 DÜRING, K., ET AL.: "Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium Erwinia carotovora" cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	3,4
A	<p>PLANT PHYSIOLOGY, vol. 105, 1994, , pages 1075-1087, XP002031338 DOLFERUS, R., ET AL.: "Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene" cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	1,2,9,12
A	<p>EP 0 278 658 A (LUBRIZOL ENTERPRISES INC ;COMMW SCIENT IND RES ORG (AU)) 17 August 1988 see the whole document</p> <p>-----</p>	1,2,9,12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

P 96/02428

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0278658 A	17-08-88	US 5001060 A	19-03-91
		AT 132903 T	15-01-96
		CA 1338858 A	21-01-97
		DE 3854870 D	22-02-96
		DE 3854870 T	04-07-96
		ES 2084582 T	16-05-96
		JP 63313588 A	21-12-88
		US 5290924 A	01-03-94
		ZA 8800320 A	11-07-88
-----			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ernationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/02428

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/82 C12N15/53 A01N63/00 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A01N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EMBL SEQUENCE DATABASE. REL. 43, 30-MAR-1995, ACCESSION NO. L40803, XP002031332 KERSANACH, R., ET AL.: "Zea mays glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GapC4) gene, promoter region" in der Anmeldung erwähnt	1,2
Y	siehe Sequenz und Anmerkungen  & NATURE, Bd. 367, 1994, Seiten 387-389, KERSANACH, R., ET AL.: ---	1,2,12, 13
	---	
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22.Mai 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30.05.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Maddox, A



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, PORTLAND, OREGON, USA, JULY 30-AUGUST 3, 1994. PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE) 105 (1 SUPPL.). 1994. 70. , XP002031350 MANJUNATH S ET AL: "Differential regulation of maize glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene family under anoxia." siehe Zusammenfassung 347 ---	1,2,12, 13
P,X	PLANT JOURNAL 10 (1). 1996. 175-183. , XP002031333 KOEHLER U ET AL: "A promoter for strong and ubiquitous anaerobic gene expression in tobacco." siehe das ganze Dokument ---	1-4,9-14
P,X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY 29 (6). 1995. 1293-1298. , Dezember 1995, XP002031334 KOEHLER U ET AL: "The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1." siehe das ganze Dokument ---	1,2,9-11
A	MOL. GEN. GENET., Bd. 229, 1991, Seiten 219-228, XP002031351 RUSSELL, D.A., ET AL.: "The maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis" siehe das ganze Dokument ---	1,2
A	PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 101, 1993, Seiten 209-216, XP002031335 YANG, Y., ET AL.: "Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in Arabidopsis" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2,9,12
A	PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 99, 1992, Seiten 615-620, XP002031336 RUSSELL, D.A., ET AL.: "Protein synthesis in maize during anaerobic and heat stress" siehe das ganze Dokument ---	1,2,9,12
	---	-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	THE PLANT JOURNAL, Bd. 3, Nr. 4, 1993, Seiten 587-598, XP002031337 DÜRING, K., ET AL.: "Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium Erwinia carotovora" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	3,4
A	PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 105, 1994, , Seiten 1075-1087, XP002031338 DOLFERUS, R., ET AL.: "Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2,9,12
A	EP 0 278 658 A (LUBRIZOL ENTERPRISES INC ;COMMW SCIENT IND RES ORG (AU)) 17.August 1988 siehe das ganze Dokument -----	1,2,9,12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

DE 96/02428

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0278658 A	17-08-88	US 5001060 A	19-03-91
		AT 132903 T	15-01-96
		CA 1338858 A	21-01-97
		DE 3854870 D	22-02-96
		DE 3854870 T	04-07-96
		ES 2084582 T	16-05-96
		JP 63313588 A	21-12-88
		US 5290924 A	01-03-94
		ZA 8800320 A	11-07-88
-----			

